

Aus den Medizinischen Kliniken und Polikliniken
der Justus Liebig-Universität Gießen

Direktoren:

Prof. Dr. H. J. Dengler, Prof. Dr. H. A. Kühn, Prof. Dr. H. G. Lasch

**Untersuchungen zur Protein-Synthese der Leber
bei der experimentellen intrahepatischen
Cholestase der Ratte**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Michael A. Schneider
aus Alzey

Gießen 1969



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545915_0078

Aus den Medizinischen Kliniken und Polikliniken
der Justus Liebig-Universität Gießen

Direktoren:

Prof. Dr. H. J. Dengler, Prof. Dr. H. A. Kühn, Prof. Dr. H. G. Lasch

**Untersuchungen zur Protein-Synthese der Leber
bei der experimentellen intrahepatischen
Cholestase der Ratte**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Michael A. Schneider

aus Alzey

Gießen 1969



Dekan: Prof. Dr. H. Rettig
Referent: Prof. Dr. H. A. Kühn
Correferent: Prof. Dr. H. J. Dengler

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
II. Material	4
III. Methoden	6
IV. Ergebnisse	16
A. Methodische Untersuchungen	16
B. Einfluß von Lithocholsäure	21
C. Einfluß von Tauroolithocholsäure zusammen mit Taurocholsäure	26
D. Tauroolithocholsäure-Cholestase	28
V. Diskussion	36
VI. Zusammenfassung	41
VII. Literatur	44
VIII. Lebenslauf	50

EINLEITUNG

Kürzlich wurde von einigen Autoren gezeigt, daß die Verfütterung von Lithocholsäure oder Tauroolithocholsäure an Ratten oder Hamster zu einer Cholestase führen kann (11, 13). So läßt sich zeigen, daß bereits kurze Zeit nach intravenöser Infusion von Tauroolithocholsäure der Gallefluß entsprechend vorbehandelter Tiere zurückgeht.

In den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde die intraperitoneale Applikation von Tauroolithocholsäure an Ratten als Modell für eine intrahepatische Cholestase gewählt.

Gleichzeitig wurden von E. Winter Untersuchungen an der Anit* - und Ikterogenin-Cholestase der Ratte durchgeführt (30).

In Untersuchungen an Leberpunktaten von Patienten mit akuter Hepatitis, florider chronischer Hepatitis, florider Leberzirrhose und einem Verschluß-Ikterus verschiedener Genese war vorher bei allen aufgezählten Erkrankungen eine erhöhte Proteinsynthese in den untersuchten Leberpunktaten nachgewiesen worden (23, 24).

Zusätzlich ließ sich ebenfalls eine Erhöhung der Nucleinsäure-, Cholesterin- und NAD-Synthese nachweisen. In der oben zitierten (30) und in der vorliegenden Arbeit sollten die bei Patienten mit Lebererkrankungen erhobenen Befunde im Tierversuch bestätigt werden, um nachfolgende Untersuchungen zu ermöglichen, die zunächst beim Menschen nicht durchführbar sind.

In den hier vorliegenden Untersuchungen wurde die Nucleinsäure-Synthese und die Protein-Synthese durch den Einbau der beiden ^{14}C -markierten Aminosäuren Glycin und Asparaginsäure in die entsprechenden Zellfraktionen gemessen. Als Kontrollsynthese diente der Einbau von ^{14}C -markierter Nikotinsäure in die Nukleotide NSAD und NAD; zusätzlich wurde der Einbau von ^{14}C -azetat in das nicht veresterte Cholesterin gemessen, da bekannt ist, daß bei Vorliegen einer intra- oder extrahepatischen Cholestase die Cholesterin-Synthese in der Rattenleber gesteigert ist (1, 4, 5, 15).

Die Untersuchungen wurden an Rattenleberschnitten *in vitro* durchgeführt.

Ein Teil der Untersuchungen wurde gemeinsam mit E. Winter durchgeführt.

* Erläuterung der in der vorliegenden Arbeit verwandten Abkürzungen: .

AP	Alkalische Phosphatase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
LAP	Leucin-Amino-Peptidase
ATP	Adenosin-triphosphat
RNS	Ribonucleinsäure
DNS	Desoxyribonucleinsäure
NAD	Nikotinsäureamid-adenin-dinukleotid
NSAD	Nikotinsäure-adenin-dinukleotid
dpm	Desintegrations per minute
UPM	Umdrehungen pro Minute
EK	Endkonzentration

II. MATERIAL

1. Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden männliche Albinoratten vom Stamm Sprague-Dawley, mit einem Gewicht von 200 - 250 g, von der Süddeutschen Versuchstierfarm in Tuttlingen bezogen.

2. Lithocholsäure

wurde von der Firma Fluka AG, Buchs SG, Schweiz bezogen.

Anfänglich wurde Lithocholsäure, später wegen der besseren Löslichkeit Tauroolithocholsäure benutzt, nachdem aus der Literatur bekannt ist, daß beide Substanzen im Tierversuch Cholestasen hervorrufen können (9, 10, 17, 18, 20 11, 12, 13, 14, 25)

3. Tauroolithocholsäure

wurde von der Firma Calbiochem, Los Angeles, bezogen als "Tauroolithocholic Acid sodium salt" A-grade, MW 505,7.

4. Taurocholsäure

wurde von der Firma Calbiochem, Los Angeles, bezogen als "Taurocholic Acid sodium salt", A-grade, MW 538,7.

III. METHODEN

1. Herstellen der Leberschnitten

Die Versuchstiere wurden mit Äthyläther narkotisiert. Durch Herzpunktion konnten etwa 8 ml Blut gewonnen werden.

Nach dem Töten der Tiere wurde die herausgenommene Leber in eiskalte physiologische Kochsalzlösung gebracht; mit einer Rasierklinge wurden dünne Leberschnitten hergestellt und insgesamt 50 mg $\pm$ 10 mg Lebergewebe in Inkubationsgläschen eingewogen.

Danach wurden 2,0 ml des eiskalten Inkubationsgemisches einpipettiert.

Die Gläschen wurden mit Carbogen begast und unter Schütteln (Warburg Schüttelthermostat) bei 37 Grad Celsius inkubiert.

Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten wurden die Leberschnitten in eiskalter physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und anschließend bis zur Weiterverarbeitung bei minus 18 Grad Celsius eingefroren.

2. Der Inkubationsansatz enthielt

1,3 μ C	14-C-L-Asparaginsäure (U)	(EK 5,75 mal 10^{-4} M)
1,3 μ C	14-C-2-Na-azetat	(EK 1,0 mal 10^{-3} M)
1,3 μ C	14-C-Glycin (U)	(EK 5,4 mal 10^{-4} M)
0,67 μ C	14-C-7-Nikotinsäure	(EK 1,5 mal 10^{-5} M)
	Glukose	(EK 5 mal 10^{-3} M)

in 2,0 ml Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer, pH 7,4.

3. Radioaktivitätsmessung

Als Scintillatormischung wurde ein Thix-Gel-Scintillator, bestehend aus

1800 ml Dioxan - 200 ml Äthanol - 252 g Naphtalin -
115 g Cab-O-Sil - 14 g 2,5-Diphenyloxazol -
350 mg 1,4-bis-2-C4-Methyl-5-Phenoxyloxylozyl-Benzol

verwandt.

Die Messung der Radioaktivität wurde im Tri-Carb-Liquid-Scintillation-Counter, Modell Nr. 3375 der Firma Packard, Frankfurt, vorgenommen.

Die Quenchkorrektur wurde mit Hilfe des externen Standards vorgenommen.

4. Tierversuche

a) Lithocholsäure

Dem Inkubationsansatz wurde Lithocholsäure in Konzentrationen von

$$10^{-4}\text{M} \quad - \quad 10^{-5}\text{M} \quad - \quad 10^{-6}\text{M}$$

pro Ansatz zugesetzt. Mit diesem Inkubationsgemisch wurden Leberschnitten von unbehandelten Tieren 60 Minuten inkubiert.

b) Lithocholsäure

(Wirkungsdauer von 1 - 2 - 3 - Tagen nach einmaliger Injektion)

150 mg Lithocholsäure pro kg Körpergewicht wurde den Versuchstieren intraperitoneal appliziert. Die Lithocholsäure wurde in 7% igem Äthanol gelöst und mit NaOH auf neutralen pH-Wert eingestellt.

Nach 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden wurden die Tiere getötet und die Leber - wie schon oben beschrieben - weiterverarbeitet.

Die Kontrolltiere erhielten das Lösungsmittel.

c) Lithocholsäure

(Wirkungsdauer von 7 - 5 - 3 - 1 - Tagen nach fünfmaliger Injektion)

-
150 mg Lithocholsäure pro kg Körpergewicht wurde den Versuchstieren an fünf aufeinanderfolgenden Tagen intraperitoneal verabreicht.

Die Kontrolltiere erhielten das Lösungsmittel.

Sieben, fünf, drei und ein Tag nach der letzten Injektion wurden die Tiere getötet und die Leber - wie schon oben beschrieben - aufgearbeitet.

d) Taurolithocholsäure

(Wirkungsdauer ein Tag nach fünfmaliger Injektion).

50 mg Taurolithocholsäure wurden in 0,2 ml Äthanol gelöst, 0,04 ml 2N NaOH dazugegeben, und mit Aqua dest. ad 5,0 ml aufgefüllt.

200 mg Taurolithocholsäure pro kg Körpergewicht wurde den Versuchstieren an fünf aufeinanderfolgenden Tagen intraperitoneal appliziert.

Die Kontrolltiere erhielten das Lösungsmittel.

Ein Tag nach der letzten Injektion wurden die Tiere getötet und die Leber - wie schon oben beschrieben - weiterbehandelt.

e) Taurolithocholsäure und Taurocholsäure

1.) 1 g Taurolithocholsäure pro kg Körpergewicht, gelöst in 4% igem Äthanol, wurde der ersten Versuchs- tiergruppe per Schlundsonde verabreicht.

2.) 2,5 g Taurocholsäure pro kg Körpergewicht, gelöst in 4% igem Äthanol, wurde der zweiten Tiergruppe appliziert.

3.) 1,0 g Tauroolithocholsäure pro kg Körpergewicht + 2,5 g Taurocholsäure pro kg Körpergewicht wurde einem dritten Kollektiv per Schlundsonde verabreicht.

Nach 48 Stunden wurden die Tierlebern - wie schon oben beschrieben - aufgearbeitet.

Die Kontrolltiere erhielten das Lösungsmittel per Schlundsonde.

5. Cholesterin-Synthese

Als Maß für die Cholesterin-Synthese wurde der Einbau von 14-C -azetat in die mit Digitonin fällbaren Lipide gewertet. (28)

Auf das tiefgefrorene Lebergewebe wurde 0,2 ml Methanol gegeben und homogenisiert. Dazu wurden weitere 0,2 ml Methanol und 0,8 ml Chloroform gegeben.

Nach 10 Minuten Stehenlassen bei 0 Grad Celsius wurde 10 Minuten bei 5000 UPM zentrifugiert und der Rückstand für weitere Untersuchungen aufgehoben. (Als Zentrifuge wurde die Laborzentrifuge der Firma Christ verwandt)

Der Überstand wurde quantitativ in neue Zentrifugengläschen gebracht und mit 0,024 n Perchlorsäure einmal gewaschen, um die wasserlöslichen Substanzen zu entfernen. (Diese werden unten als Fraktion II der NAD-Synthese weiterverarbeitet) Die so gewonnene Gesamtlipidfraktion wurde mit Äthanol ad 4,0 ml aufgefüllt.

Zu 2,0 ml davon wurden dann 1 mg Cholesterin (gelöst in 96 % Äthanol) und 4,0 ml Digitonin-Lösung (0,5 % in 50 % Äthanol) gegeben, die Gläschen verschlossen und über Nacht stehen gelassen.

Danach wurde 10 Minuten zentrifugiert und der Über-

stand verworfen. Der Rückstand wurde einmal mit Azeton-Äther (1:3) und einmal mit Äther gewaschen. Auf den trockenen Niederschlag wurde 1,0 ml Eis-essig gegeben und aufgelöst.

Zu 0,4 ml dieser Lösung wurden 15,0 ml Thix-Gel-Scintillator in einem Tri-Carb-Scintillations-Gläschen zugesetzt und die Radioaktivität, wie schon vorher beschrieben, gemessen.

6. NAD-Synthese

Als Maß für die NAD-Synthese wurde der Einbau von 14-C-Nikotinsäure in die mit Azeton fällbaren Nukleotide NSAD und NAD gewertet. (7, 29)

Fraktion I

Der Leberückstand nach der Lipid-Extraktion wurde mit 1,0 ml eiskalter Perchlorsäure (0,6 N) aufgeschwemmt und 10 Minuten im Eisbad stehengelassen. Dann wurde 10 Minuten zentrifugiert und der klare Überstand in andere Zentrifugengläser gegeben. Der Rückstand wurde für die Messung anderer Synthesen aufbewahrt.

Dem Überstand wurden 1,0 ml eines ATP-NAD-Gemisches (20 mg ATP, 20 mg NAD pro 1,0 ml Aqua dest.) und 2,0 ml Azeton (-18 Grad Celsius) zugesetzt.

Mit einem Glasstab wurde an der Innenwand der Zentrifugengläser so lange gerieben, bis eine sichtbare Fällung eintrat. Die Gläser wurden 12 Stunden bei minus 18 Grad Celsius aufbewahrt. Nach Zentrifugieren und Verwerfen des Überstandes wurde einmal mit Azeton und einmal mit Äther gewaschen. Der trockene Niederschlag wurde in 0,5 ml Aqua dest. gelöst. Von dieser Lösung wurden 0,4 ml zusammen mit 10 ml Thix-Gel-Scintillator in ein Zählgläschen gegeben.

Fraktion II

Die aus dem Lipidextrakt gewonnenen wasserlöslichen Nukleotide wurden wie Fraktion I behandelt. Bei der Aufstellung der Endergebnisse wurden die Werte von Fraktion I und Fraktion II zusammengefaßt.

7. Nucleinsäure-Synthese

Als Maß für die Nucleinsäure-Synthese wurde der Einbau von ^{14}C -Glycin und ^{14}C -Asparaginsäure in die bei 80 Grad Celsius durch Perchlorsäure extrahierbaren Nucleinsäuren gewertet.

Der Rückstand, der aus der NAD Fraktion I übriggeblieben war, wurde mit eiskalter Perchlorsäure (0,6 n) gewaschen, und anschließend die Nucleinsäuren mit 1,0 ml Perchlorsäure (0,6 n) eine Stunde bei 80 Grad Celsius

extrahiert. 0.2 ml des Extraktes wurden zusammen mit 15,0 ml Thix-Gel-Scintillator in ein Zählgläschen gegeben.

8. Protein-Synthese

Als Maß für die Protein-Synthese wurde der Einbau von ^{14}C -Glycin und ^{14}C -Asparaginsäure in die Perchlorsäure-unlösliche Fraktion der Rattenleberschnitten gewertet. Der Rückstand nach der Nucleinsäure-Extraktion wurde mit Äthanol und Äther je einmal gewaschen und getrocknet und danach in 0,5 ml konzentrierter Ameisensäure gelöst.

0,4 ml dieser Lösung wurden zusammen mit 10,0 ml Thix-Gel-Scintillator in Zählgläschen gegeben.

9. Serumbestimmungen

Das durch Herzpunktion gewonnene Blut wurde 60 Minuten bei 4 Grad Celsius gekühlt, 10 Minuten bei 1500 UPM zentrifugiert und das Serum abpipettiert.

Bestimmt wurden die GPT, LAP, AP, als kinetische Tests; das Gesamt-Bilirubin und Gesamt-Cholesterin als Farbtests mit den angegebenen Testsätzen. Für die Messungen wurde ein Photometer der Firma Eppendorf benutzt.

10. Signifikanzberechnung

Die Signifikanzen wurden nach dem t-Test berechnet.

11. Histologische Untersuchungen

Das Anfertigen und Färben der histologischen Präparate erfolgte im histologischen Labor der Medizinischen Universitäts-Klinik, Gießen.

Für die Beurteilung der Präparate sind wir Herrn
Dr. med. B. Leinweber zu großem Dank verpflichtet.

IV. ERGEBNISSE

A Methodische Untersuchungen

Tabelle 1 gibt noch einmal gekürzt und zusammengefaßt den Aufarbeitungsgang wieder:

1. Narkotisieren der Tiere, Herzpunktion und Herausnahme der Leber;
2. Herstellen der Leberschnitten;
3. Wiegen des feuchten Lebergewebes;
4. Inkubation mit

1,3 μ C	14-C-L-Asparaginsäure (U)	(EK 5,75 x 10 ⁻⁴ M)
1,3 μ C	14-C-2-Na-azetat	(EK 1,0 x 10 ⁻² M)
1,3 μ C	14-C-Glycin (U)	(EK 5,4 x 10 ⁻⁴ M)
0,6 μ C	14-C-7-Nikotinsäure	(EK 1,5 x 10 ⁻³ M)
	Glucose	(EK 5,0 x 10 ⁻³ M)

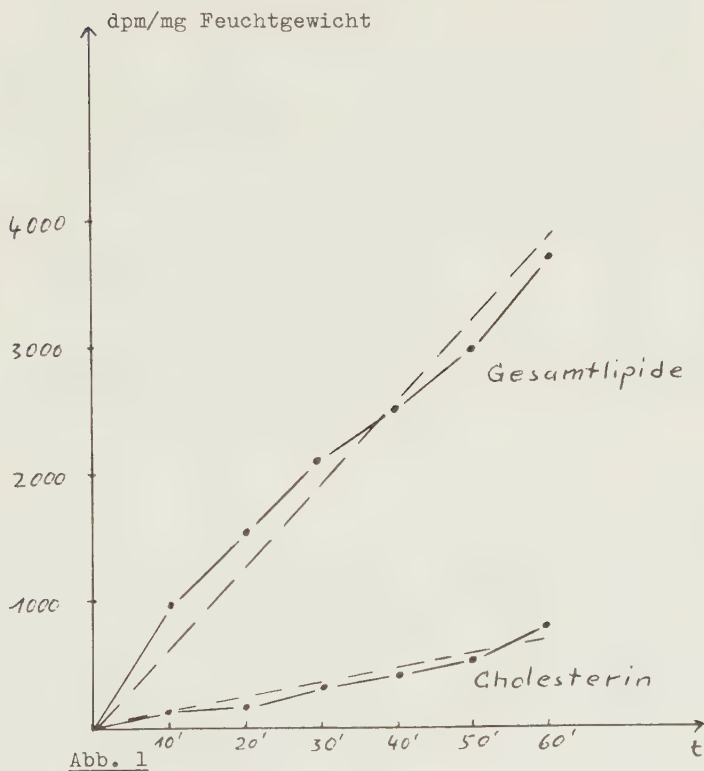
in 2,0 ml Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer pH 7,4;
Temp. 37 Grad Celsius; t 60 Minuten;
Carbogen Atmosphäre;

Einfrieren und Auftauen

6. Lipidextraktion mit Methanol/Chloroform;
7. Nukleotideextraktion mit Perchlorsäure bei 0 Grad Celsius;
8. Nucleinsäureextraktion mit Perchlorsäure bei 80 Grad Celsius;
9. Waschen und Trocknen des Proteinrestes;
10. Bestimmung der Serumwerte;

Tabelle Nr. 1

Abbildung 1 zeigt, daß der Einbau von ^{14}C -azetat in das unveresterte Cholesterin und in die Gesamtlipidfraktion zeitabhängig linear abläuft.



Einbau von ^{14}C -azetat in das unveresterte Cholesterin und in die Gesamtlipidfraktion in Abhängigkeit von der Zeit.

Tabelle 2 zeigt an einem Kollektiv von jeweils acht Stichproben befriedigende Übereinstimmung von Doppelwerten sämtlicher ~~gemessenen~~ Synthesen.

Zeit	n	Cholesterin-Synthese	NAD Synthese	Protein-Synthese	Nucleinsäure-Synthese
		dpm/mg Feuchtgewicht			
60'	8	107	476	676	161
60'	8	135	515	633	185

Tab. 2

Vergleich zweier zufällig ausgewählter Stichproben für die Cholesterin-, NAD-, Protein- und Nucleinsäure-Synthese.

Inkubation und Aufarbeitung siehe Methodik.

Tabelle 3 (6)

zeigt, daß die Proteinsynthese und die NAD-Synthese nur dann ablaufen, wenn der Energiestoffwechsel der inkubierten Rattenleberschnitten nicht gehemmt wird. (Hemmung der Synthesen unter Einfluß von KCN, Jodazetat und Stickstoff)

Aktinomycin D und Fluorazetat führen ebenfalls zu einer beträchtlichen Hemmung der Protein- und NAD-Synthese, während die Nucleinsäure-Synthese überwiegend geringer beeinflußt wird.

Inkubations-Bedingung	Protein-Synthese	NAD-Synthese	Nucleinsäure-Synthese
	% d. Kontrolle		
mit KCN	6	3	16
mit Jodazetat	6	3	34
mit Stickstoff	3	5	56
mit Actinomycin D	13	9	62
mit Fluorazetat	42	43	86

Tab. 3 (6)

Einfluß verschiedener Hemmstoffe auf die Protein-NAD- und Nucleinsäure-Synthese.

In späteren Versuchen, die nicht mehr Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind, wurde deshalb ein anderes Extraktionsverfahren für die Nucleinsäuren gewählt.

Weitere methodische Untersuchungen (22) zeigen:

1. Es besteht eine lineare Abhängigkeit der Protein- und NAD-Synthese vom eingesetzten Feuchtgewicht des Lebergewebes.
2. Es besteht eine lineare Abhängigkeit der Protein- und NAD-Synthese von der Inkubationszeit.
3. Protein und die Nucleinsäuren werden überwiegend von den eingesetzten Aminosäuren synthetisiert.
4. NAD wird meßbar nur aus der eingesetzten Nikotinsäure synthetisiert.
5. Alle Synthesen laufen nur dann ab, wenn Sauerstoff zugegen ist, oder wenn die Atmung und der Energiestoffwechsel intakt sind (siehe Tab.3).

B Untersuchungen über den Einfluß von
Lithocholsäure

Zuerst wurde geprüft, ob der Zusatz von Lithocholsäure zum Inkubationsmedium bereits Änderungen der in der Methodik beschriebenen Syntheseleistungen hervorrufen kann.

Wie aus der Tabelle 4 hervorgeht, hat der Zusatz von Lithocholsäure bis zu einer Konzentration von $10^{-4}M$ keinen wesentlichen Einfluß auf die Syntheseleistungen der inkubierten Leberschnitten. Eine höhere Konzentration im Inkubationsmedium ließ sich aufgrund der schlechten Löslichkeit der Lithocholsäure nicht erreichen.

Die Syntheseleistungen scheinen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe, die nur mit Puffer inkubiert wurde, eher niedrig zu sein; dieser Effekt wird aber aufgehoben, wenn man als Kontrollgruppe - wie in Spalte 1 - den Inkubationsansätzen das Lösungsmittel, in dem die Lithocholsäure gelöst war, zusetzt.

Das Natrium-Salz der Phenyläthylbarbitursäure (Luminal), von dem bekannt ist, daß es in der Leber die Bildung mikrosomaler Enzymsysteme stimulieren kann (3, 8, 19, 26, 27) und damit gleichzeitig die

Proteinsynthese in der Leberzelle steigert, hat in vitro ebenfalls keinen Einfluß auf die gemessenen Syntheseleistungen.

Versuchsbedingungen	n	Cholesterin-Synthese	NAD-Synthese	Protein-Synthese	Nucleinsäure-Synthese
		dpm/mg Feuchtgewicht			
Kontrolle Lösungs- mittel	7	96 + 40 - 40	340 + 220 - 220	380 + 196 - 196	143 + 99 - 99
Luminal- $10^{-3}M$	2	107	1111	488	304
KRP CO ₂ Puffer	4	65 + 36 - 36	768 + 617 - 617	645 + 208 - 208	196 + 44 - 44
Lithochol- säure $10^{-4}M$	8	94 + 28 - 28	458 + 179 - 179	446 + 162 - 162	172 + 67 - 67
Lithochol- säure $10^{-5}M$	2	86	473	374	132
Lithochol- säure $10^{-6}M$	2	76	378	325	89

Tab. 4

Einfluß verschiedener Lithocholsäure-Konzentrationen auf die Cholesterin-, NAD-, Protein- und Nucleinsäure-Synthese an Rattenleberschnitten in vitro. Inkubationsansatz und aufarbeitung siehe Methodik.

Es darf aufgrund der in der Tabelle aufgeführten Versuche angenommen werden, daß die Anwesenheit von Lithocholsäure im Inkubationsmedium, wie sie auch für die Versuche in vivo angenommen werden muß, keinen direkten Einfluß auf den Ablauf der Synthesen hat. In den Tabellen 5 und 6 wird gezeigt, warum die eigentlichen Untersuchungen an den Versuchstieren 24 Stunden nach fünfmaliger Injektion von Tauroolithocholsäure erfolgten.

Versuchsbedingungen	n	Cholesterin-Synthese	NAD-Synthese	Protein-Synthese	Nucleinsäure-Synthese
		dpm/mg Feuchtgewicht			
Kontrolle	6	94 + 26	375 + 195	306 + 85	137 + 29
1 Tag nach 150 mg/kg Lithochol- säure	2	81	115	217	130
2 Tage nach 150 mg/kg Lithochol- säure	2	107	848	358	211
3 Tage nach 150 mg/kg Lithochol- säure	2	123	316	298	140

Tab. 5

Cholesterin-, NAD-, Protein- und Nucleinsäure-Synthese in Rattenleberschnitten 24 - 48 und 72 Stunden nach einmaliger intraperitonealer Injektion von Lithocholsäure.

Wie Tabelle 5 zeigt, führt die einmalige Injektion von 150 mg Lithocholsäure pro kg Körpergewicht weder 24 Stunden, noch 48 Stunden, noch 72 Stunden nach der Injektion zu einer nennenswerten Änderung der Syntheseleistungen der inkubierten Leberschnitten.

Aus Tabelle 6 geht hervor, daß lediglich am ersten Tage nach fünfmaliger Lithocholsäure Injektion deutliche Änderungen der Syntheseleistungen der Leberschnitten auftreten, während bereits nach 3, 5 und 7 Tagen kein messbarer Einfluß mehr nachzuweisen ist.

Tabelle Nr. 6 siehe nächste Seite.

Versuchs- bedingungen	n	Cholesterin- Synthese	NAD- Synthese	Protein- Synthese	Nucleinsäure- Synthese
		dpm/mg Feuchtgewicht			
Kontrolle	6	84	115	118	89
Lösungs- mittel		+ 47	+ 98	+ 68	+ 63
7 Tage nach 5 x 150 mg/kg Lithochol- säure	2	94	292	144	113
5 Tage nach 5 x 150 mg/kg Lithochol- säure	1	188	41	70	158
3 Tage nach 5 x 150 mg/kg Lithochol- säure	2	69	171	59	84
1 Tag nach 5 x 150 mg/kg Lithochol- säure	2	305	876	1387	340

Tab. 6

Cholesterin-, NAD-, Protein- und Nucleinsäure-Synthese in Rattenleberschnitten sieben, fünf, drei und ein Tag nach fünfmaliger intraperitonealer Injektion von Lithocholsäure.

C. Einfluß von Tauroolithocholsäure zusammen mit Taurocholsäure

Die intraperitoneale Injektion erwies sich deshalb als notwendig, da selbst mit der fünffachen Dosis Tauroolithocholsäure-oral appliziert - auch nach Zusatz von Taurocholsäure, keine signifikanten Änderungen der Syntheseleistungen in der Leber erzielt werden konnten. Dieses geht aus der Tab.Nr.7 hervor.

Versuchsbedingungen	n	Cholesterin-Synthese	NAD-Synthese	Protein-Synthese	Nucleinsäure-Synthese
		dpm/mg Feuchtgewicht			
Kontrolle	2	12	173	202	123
2 Tage nach 1 g/kg Tauroolithocholsäure	6	16 + 3	311 + 227	188 + 86	72 + 20
2 Tage nach 2,5 g/kg Taurocholsäure	6	14 + 6	297 + 182	304 + 181	163 + 22
2 Tage nach 1 g/kg Tauroolithocholsäure		16	282	203	148
2,5 g/kg Taurocholsäure	6	+ 3	+ 184	+ 83	+ 89

Tab. 7

Cholesterin-, NAD-, Protein- und Nucleinsäure-Synthese in Rattenleberschnitten zwei Tage nach oraler Applikation (Schlundsonde) von Tauroolithocholsäure, Taurocholsäure und Tauroolithocholsäure zusammen mit Taurocholsäure.

Wie Tabelle 8 zeigt, sind unter diesen Bedingungen ebenfalls die Leberfunktionsproben unverändert geblieben.

Versuchsbedingungen	n	Gesamt-Bilirubin	GPT	AP	LAP	Gesamt-Cholesterin
		mg %	mU / ml			mg %
Kontrolle	6	0,37 + 0,20	24,8 + 7,9	373 + 69	16,8 + 10,0	69,5 + 5,7
2 Tage nach 1g/kg Tauroolithocholsäure	3	0,16	22	426	38	78
2 Tage nach 2,5 g/kg Taurocholsäure	3	0,39	30	446	37	78
2 Tage nach 1g/kg Tauro- lithochol- säure und 2,5 g/kg Taurochol- säure	3	0,15	23	378	32	65

Tab. 8

Leberfunktionsproben im Rattenserum zwei Tage nach oraler Applikation von Tauroolithocholsäure, Taurocholsäure und Tauroolithocholsäure zusammen mit Taurocholsäure.

D. Untersuchungen bei der Taurolithocholsäure-Cholestase

Aufgrund der Ergebnisse der oben skizzierten Versuche wurden die wesentlichen Untersuchungen an Tieren durchgeführt, denen 5 Tage lang jeweils einmal täglich 200 mg Taurolithocholsäure pro kg Körpergewicht injiziert worden war. Taurolithocholsäure wurde deshalb verwandt, weil sie im Vergleich zur Lithocholsäure besser löslich ist und einen ähnlichen cholestatischen Effekt wie Lithocholsäure besitzt. (11, 13, 14, 25)

Wie aus Tabelle 9 hervorgeht, führt die fünfmalige intraperitoneale Applikation von Taurolithocholsäure zu keinen signifikanten Veränderungen des Bilirubins, der Transaminasen, der alkalischen Phosphatase, der Leucin-Amino-Peptidase und des Gesamt-Cholesterins im Serum.

Tabelle 9 siehe nächste Seite

Versuchs- bedingungen	n	Gesamt- Bilirubin	GPT	AP	LAP	Gesamt- Cholest.
		mg %	mU / ml			mg %
Kontrolle	5	0,5	13,9 + 2,2 - 2,2	450 +132	20,5 + 3,2 - 3,2	74 +16,6
1 Tag nach 5 x 200 mg/kg Tauroolitho- cholsäure	14	0,5	20,1 + 9,3 - 9,3	589 +290	21 + 4,2 - 4,2	81,5 +17,7
P	--	---	> 0,40	> 0,15	> 0,30	> 0,20

Tab. 9

Leberfunktionsproben im Rattenserum ein Tag nach fünfma-
liger intraperitonealer Applikation von Tauroolithochol-
säure.

Versuchs- bedingungen	n	Cholest. Synthese	NAD- Synthese	Protein- Synthese	Nucleinsäure- Synthese
		dpm/mg Feuchtgewicht			
Kontrolle	16	121 + 65 - 65	495 +132	654 +155	173 + 41
1 Tag na h 5 x 200 mg pro kg Tauro- lithocholsäure	6	886 +416	555 + 72	2542 + 641	847 +129
P	-	< 0,0005	> 0,10	< 0,0005	< 0,0005

Tab. 10

Cholesterin-, NAD-, Protein- und Nucleinsäure-Synthese
in Rattenleberschnitten ein Tag nach fünfmaliger intra-
peritonealer Applikation von Tauroolithocholsäure.

Wie Tabelle 10 zeigt, ist vor allen Dingen die Protein-Synthese nach Tauroolithocholsäure-Behandlung auf etwa das Vierfache der Norm signifikant gesteigert. Diese Stimulierung betrifft ebenfalls die Nucleinsäure-Synthese und die Cholesterin-Synthese. Im Gegensatz zu Untersuchungen bei der Ikterogenin- und ANIT-Cholestase der Ratte (30) ließ sich in diesen Untersuchungen keine Steigerung der NAD-Synthese nachweisen.

Da die gemessenen Synthesen ATP-abhängig sind, sollte eine Senkung des ATP-Spiegels in den Leberschnitten auch zu einer Verminderung der Syntheseraten führen.

Ersetzt man in den Inkubationsansätzen die Glucose durch Glucosamin (Tab.11), welches nach Untersuchungen von Krantz (16) in Ehrlich-Ascites-Tumorzellen zu einer deutlichen Erniedrigung des ATP-Spiegels führt, so lassen sich die vorher als erhöht gemessenen Syntheseraten gegenüber den entsprechenden Kontrollen in der Tabelle 10 nach Glucosamin-Gabe nahezu vollständig normalisieren. Gegenüber gleichbehandelten Kontrollen, die also ebenfalls mit Glucosamin im Inkubationsansatz inkubiert worden waren, bleiben die Syntheseraten zwar nicht mehr so ausgeprägt, aber noch deutlich und signifikant erhöht.

Dies geht aus der Tabelle Nr. 11 hervor.

Versuchs- bedingungen	n	Cholester. Synthese	NAD- Synthese	Protein- Synthese	Nucleinsäure- Synthese
		dpm/mg Feuchtgewicht			
Kontrolle	8	33 + 18 - 18	217 + 59 - 59	356 + 135 - 135	342 + 224 - 224
1 Tag nach 5 x 200 mg/kg Tauroolitho- cholsäure	16	99 + 42 - 42	497 + 147 - 147	735 + 161 - 161	385 + 187 - 187
P	--	< 0,0005	< 0,025	< 0,0005	> 0,25

Tab. 11

Cholesterin-, NAD-, Protein- und Nucleinsäure-Synthese in Rattenleberschnitten ein Tag nach fünfmaliger intraperitonealer Applikation von Tauroolithocholsäure.

Ersatz der Glucose im Inkubationsansatz durch Glucosamin.

Wie weit sich dieser in vitro zu beobachtende Glucosamineffekt auf Verhältnisse in vivo übertragen läßt, und wie weit sich aus ihm Schlüsse auf die Ursachen der durch Taurolithocholsäure ausgelösten Synthese-Steigerungen in der Leber ziehen lassen, bedarf weiterer Untersuchungen, die nicht mehr Gegenstand dieser Arbeit sind.

Histologische Veränderungen bei der Tauroolithocholsäure-Cholestase:

Die feingewebliche Untersuchung erbrachte in dem nach v. Gieson gefärbten Präparat keine auffälligen Veränderungen. Die Periportalfelder waren normal breit und nicht fibrosiert.

In den mit HE gefärbten Präparaten ließen sich keine Infiltrationen im Bereich der Periportalfelder nachweisen. (Abb. 2) Die Leberarchitektur war erhalten. (Abb. 3) Es fanden sich keine Leberzellnekrosen oder degenerative Veränderungen im Bereich der Zentralvenen. (Abb.4) Das Sternzellsystem erschien ruhig. An keiner Stelle war eine Proliferation der Sternzellen oder gar Sternzellknötchen erkennbar. (Abb.3, Abb.4)

Die Kontrollpräparate ließen histologisch keinen Unterschied zu den oben erwähnten Präparaten erkennen. (Abb.5)

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß lichtmikroskopisch an den Leberschnitten von Ratten mit experimenteller Tauroolithocholsäure-Cholestase keine Veränderungen beobachtet werden konnten.

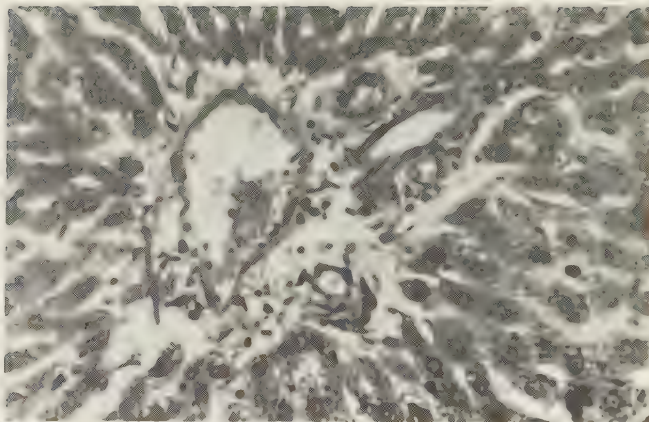


Abb. 2

Unauffälliges Periportalfeld, keine Verbreiterung,
keine Entzündungsreaktionen.



Abb. 3

Normales Lebergewebe unter Tauroolithocholidsäure.

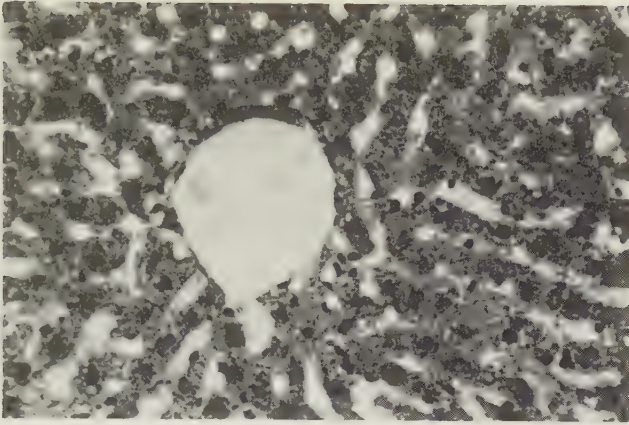


Abb. 4

Taurolithocholsäure: Unauffälliges Zentralgebiet.

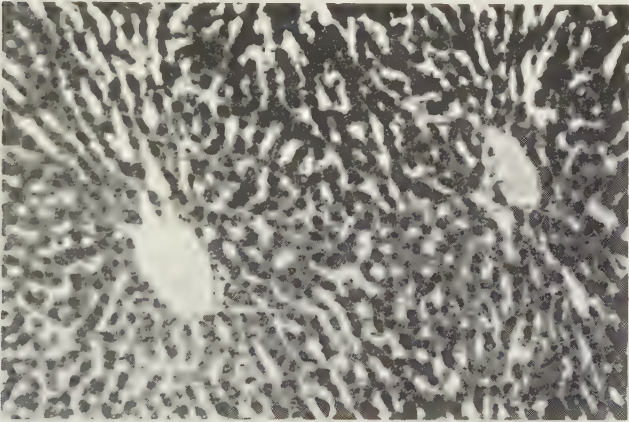


Abb. 5

Kontrollpräparat. Unauffälliges Lebergewebe.

V. DISKUSSION

Eine kurze Zusammenfassung der Ergebnisse soll der Diskussion vorausgehen.

Wie bereits erwähnt, lassen sich erstmals Hinweise auf das Vorliegen einer Cholestase ein Tag nach fünfmaliger intraperitonealer Lithocholsäure-Injektion finden.- Orale Applikation von Tauroolithocholsäure führt auch nach Zusatz von Taurocholsäure weder zu Änderungen der Syntheseleistungen, noch zu Änderungen der Leberfunktionsproben.- Die intraperitoneale Applikation von Tauroolithocholsäure, von der bekannt ist, daß sie bei Verfütterung an Ratten oder Hamster, einen Rückgang des Galleflusses zur Folge hat, (9, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 18, 25) führt in den hier vorliegenden Untersuchungen zu einer Steigerung der Protein-Synthese in der Rattenleber auf das Vierfache der Norm. Auch die Nucleinsäure- und Cholesterin-Synthese ist gesteigert, während sich für die NAD-Synthese keine wesentliche Steigerung nachweisen läßt. Die Leberfunktionsproben sind bei der Tauroolithocholsäure-Cholestase nicht signifikant geändert.- Glucosamin, das an Stelle von Glucose dem Inkubationsansatz beigelegt wurde, normalisiert die Steigerung der Syntheseraten.

Wie bei der Ikterogenin-Cholestase, aber im Gegensatz zur ANIT-Cholestase der Ratte (30), kommt es auch nach intraperitonealer Verabreichung von Taurolithocholsäure nicht zum Auftreten von signifikanten Veränderungen im Serum, wie aus der Tabelle 9 hervorgeht. Dennoch lassen sich wie in den Untersuchungen verschiedener Lebererkrankungen beim Menschen, deutlich gesteigerte Syntheseleistungen in der Rattenleber nachweisen. Die vor allem interessierende Protein-Synthese ist im Mittel auf das Vierfache der Norm gesteigert; diese Steigerung ist aber nicht für die Protein-Synthese spezifisch, sondern läßt sich gleichfalls für die Nucleinsäure- und für die Cholesterin-Synthese nachweisen. Lediglich die NAD-Synthese blieb in diesen Untersuchungen unverändert.

Kürzlich ist von Popper (21) gezeigt worden, daß es bei der intrahepatischen Cholestase der Ratte und des Menschen zu einer deutlichen Vermehrung des endoplasmatischen Retikulums kommt, in dem die Cholesterin-Synthese abläuft. (2)

Obwohl die elektronenoptischen Untersuchungen zu den in der hier vorliegenden Arbeit aufgeführten Versuchen noch ausstehen, darf angenommen werden, daß es auch in unseren Versuchen unter Taurolitho-

cholsäure zu einer Vermehrung des endoplasmatischen Retikulums kommt.

Trotz erheblich gesteigerter Cholesterin-Synthese ist es nicht zu einer signifikanten Steigerung des Serum-Cholesterins bei den untersuchten Tieren gekommen, während es bei den Untersuchungen der ANIT-Cholestase (30) und beim experimentellen Gallengangs-Verschluß neben der erhöhten Cholesterin-Synthese auch zu einem Anstieg des Serum-Cholesterins kommt.

(15) Da die Cholesterin-Synthese in diesen Untersuchungen nicht intensiver gesteigert war als in den hier vorliegenden Untersuchungen, muß angenommen werden, daß dem Verschluß der Gallenwege, der auch zum Teil der ANIT-Cholestase zugrunde liegt, (nekrotisierende Cholangitis) eine besondere Bedeutung zukommt, zumindest, was den Zeitpunkt der Erhöhung des Serum-Cholesterins betrifft. Es kann demnach nicht davon ausgegangen werden, daß der erhöhte Serum-Cholesterin-Spiegel bei Patienten mit Verschlußikterus nur durch eine Erhöhung der Cholesterin-Synthese in der Leber hervorgerufen wird.

In den vorliegenden Untersuchungen wird gezeigt, daß auch bei der Tauroolithocholsäure-Cholestase der Ratte eine erheblich gesteigerte Protein-Synthese in der Leber in vitro gefunden wird. Wie bereits mehrfach

erwähnt, finden sich diese Veränderungen auch bei verschiedenen Lebererkrankungen beim Menschen und bei der experimentellen ANIT- und Ikterogenin-Cholestase an der Rattenleber, sodaß angenommen werden muß, daß eine der Reaktionen, mit der die Leber auf Schädigungen reagiert, eine erhöhte Protein-Synthese in der Leber ist. Gleichfalls erhöht war in den hier durchgeführten Untersuchungen die Nucleinsäure-Synthese, wobei in nachfolgenden Untersuchungen von Grün (6) mit veränderter Methodik gezeigt wurde, daß sowohl die RNS-, als auch die DNS-Synthese gesteigert ablaufen.

Es kann also festgehalten werden, daß es bei ätiologisch unterschiedlichen Lebererkrankungen zu einer unspezifischen Steigerung der Protein-Synthese in der Leber kommt; unspezifisch deshalb, weil auch andere Synthesen in gleichem Ausmaße ansteigen.

Da es bei der akuten Hepatitis in der akuten Phase zu einer stärkeren Steigerung der Protein-Synthese in der Leber kommt, als in der abklingenden Phase der Hepatitis, muß überlegt werden, ob nicht der gesteigerten Protein-Synthese selbst, besonders für den Ablauf der Hepatitis, eine Bedeutung zukommt. Nachfolgende Untersuchungen von Grün (6) scheinen dies zu bestätigen. Es läßt sich zeigen, daß bei der ANIT-Cholestase der Ratte die Serumveränderungen deutlich

geringer sind, wenn die Protein-Synthese in der Leber durch gleichzeitige Applikation von Cycloheximid gehemmt wird.

Die Versuche, in denen Glucose durch Glucosamin im Inkubationsansatz ersetzt worden war, zeigen, daß es in vitro möglich ist, durch die Gabe dieses Aminosuckers die Protein-Synthese in vitro zu senken, wobei entsprechende Versuche in vivo noch ausstehen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Erzeugung einer intrahepatischen Cholestase in der Rattenleber und die Messung der Veränderungen der Syntheseleistungen der Leber.

Die erhebliche Steigerung der Proteinsynthese in Leberpunktionszylindern (22, 23) von Patienten mit akuter Hepatitis gegenüber einem normalen Kontrollkollektiv gab den Anstoß für die vorliegenden Untersuchungen. Sie sollen als Beitrag zur Frage dienen, ob die Steigerung der Protein-Synthese spezifisch für den Virusinfekt ist.

Die Untersuchungen wurden an Rattenleberschnitten durchgeführt.

Als Maß für die Nucleinsäure- und Protein-Synthese wurde der Einbau der beiden ^{14}C -markierten Aminosäuren Glycin und Asparaginsäure in die entsprechenden Zellfraktionen gewertet. Zusätzlich wurde der Einbau von ^{14}C -Azetat in das nicht veresterte Cholesterin gemessen. Als Kontrollsynthese diente der Einbau von ^{14}C -Nikotinsäure in die Nukleotide NSAD und NAD. Im Serum wurden das Gesamt-Bilirubin, die alkalische Phosphatase, die Leucin-Amino-Peptidase, die Transaminasen und das Gesamt-Cholesterin photo-

metrisch bestimmt. Bei der Erzeugung der intrahepatischen Cholestase wurde die Tauroolithocholsäure wegen ihrer besonderen Löslichkeit der Lithocholsäure bei den wesentlichen Versuchen vorgezogen. Die intraperitoneale Applikation wurde deshalb gewählt, da bei oraler Applikation selbst die fünffache Dosis der Tauroolithocholsäure ohne Effekt blieb.

Außerdem wurde der Einfluß von direkt dem Inkubationsansatz zugesetzter Lithocholsäure auf die Leberschnitten untersucht.

ERGEBNISSE

1. Die Untersuchungen über den Einfluß von Lithocholsäure in vitro zeigen, daß bis zu einer Konzentration von $10^{-4}M$ kein wesentlicher Einfluß auf die Syntheseleistungen der Leberschnitten vorliegt.
2. Die einmalige Injektion von Lithocholsäure führt weder 24 Stunden, noch 48 Stunden, noch 72 Stunden nach der Injektion zu einer nennenswerten Änderung der Syntheseleistungen. Am ersten Tage nach fünfmaliger Lithocholsäure-Injektion treten erstmalig deutliche Änderungen der Syntheseleistungen auf.
3. Die orale Applikation von Tauroolithocholsäure führt auch nach Zusatz von Taurocholsäure zu keinen signifikanten Änderungen der Syntheseraten. Auch die Leberfunktionsproben bleiben unverändert.

4. Bei den Untersuchungen der Tauroolithocholsäure-Cholestase kommt es einen Tag nach fünfmaliger intraperitonealer Injektion zu keinen signifikanten Veränderungen der Leberfunktionsproben. Die Synthesleistungen in der Leber liegen jedoch deutlich höher. Die Protein-Synthese ist bis auf das Vierfache der Norm gesteigert, während sich für die NAD-Synthese keine wesentliche Steigerung nachweisen läßt.

5. Eine Senkung des ATP-Spiegels in den Leberschnitten durch Glucosamin läßt die Syntheseraten nahezu bis zu Normalwerten absinken.

Die Ergebnisse werden diskutiert.

VII. LITERATUR

1. Byers, S.O., Friedmann, M., Michaelis, F.:

Observations concerning the production and
excretion of cholesterol in mammals.

J.biol.Chem. 188, 637 (1951)

2. Chesterton, Ch,J.:

Distribution of Cholesterol Precursors and other
Lipids among Rat Liver Intracellular Structures.

Evidence for the Endoplasmic Reticulum As the
Site of Cholesterol and Cholesterol Ester Synthesis.

J.biol.Chem. 243; 1147 (1968)

3. Conney, A.H. et al.:

Adaptive increases in drug-metabolizing enzymes
induced by phenobarbital and other drugs.

J. Pharmacol. exp. Ther. 130; 1 (1960)

4. Fredrickson, D.S., Loud, A.V., Hinkelmann, B.T.,
Schneider, H.S., Frantz, I.D.:

The effect of ligation of the common bile duct on
cholesterol synthesis in the rats.

J. exp. Med. 99, 43 (1954)

5. Friedman, M., Byers, S.D.:

Observations concerning the production and excretion of cholesterol in mammals.

J.clin.Invest. 34; 1369 (1955)

6. Grün, M.:

Inaugural Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Justus Liebig-Universität Gießen in Vorbereitung.

7. Hamao, Ijichi, Arata Ichiyama, Osamu Hayaischi:

Studies on the Biosynthesis of Nicotinamide Adenine Dinucleotide.

J. Biol. Chem. 241; 3701-3707 (1966)

8. Herdson, P.B., Garvin, P.J., Jennings, R.B.:

Fine structural changes in rat liver induced by phenobarbital.

Lab. Invest. 13; 1032 (1964)

9. Hunt et al.:

Dictary Bile Acids and Lipid Metabolism.

Proc. Soc. exp. Biol. 113; 139 (1963)

10. Hunt, R.D.:

Proliferations of Bile Ductules induced by

Lithocholic Acid.

Fed. Proc. 24; 431 (1965)

11. Javitt, N.B., Emerman, S.:

The Mechanism of Cholestatic Jaundice Induced by
Tauroolithocholic Acid.

J. Clin. Invest. 45; 1028 (1966)

12. Javitt, N.B., Arias, J.M.:

Intrahepatic Cholestasis: A Functional Approach
to Pathogenesis.

Gastroenterology, 53; 171 (1967)

13. Javitt, N.B.:

Cholestasis in Rats induced by Tauroolithocholate.

Nature 210; 1262 (1966)

14. Javitt, N.B.:

An experimental model for the study of cholestasis.

Gastroenterology 50; 394 (1966)

15. Kattermann, R.W., Creutzfeld:

Lipid Synthesis in Rat Liver in Experimental
Cholestasis.

V. International Meeting of the International Association
for the Study of the Liver.

Karlobad 1968

16. Krantz, O.:

Inaugural Dissertation an der Medizinischen
Fakultät der Justus Liebig-Universität Gießen
in Vorbereitung

17. Palmer, R.H.:

Gallstones produced experimentally by Lithocholic
Acid in Rats.

Science 148; 1339 (1965)

18. Palmer, R.H.:

Production of Bile Duct Hyperplasia and Gall-
stones by Lithocholic Acid.

J.Clin.Invest. 45; 1255 (1966)

19. Popper, H.:

Panel discussion on drug injury.

V. International Meeting of the International
Association for the study of the Liver. Prag 1968.

20. Popper, H.:

Vortrag in der Medizinischen Klinik Gießen:
Über die intrahepatische Cholestase. Gießen 1967.

21. Popper, H.:

Über die intrahepatische Cholestase. Vulpera 1968.

22. Richter, E.:

Messung verschiedener Syntheseleistungen der menschlichen Leber in Leberpunktaten.

8. Internationaler Kongreß für Gastroenterology.
Prag 1968.

23. Richter, E., Clauditz, S., Leinweber, B.,
Kühn, H.A.:

Erhöhte Protein-Synthese in Leberpunktaten von Patienten mit akuter Hepatitis.

Acta Hepatosplen. 6 (1968)

24. Richter, E.:

Protein Synthesis in needle biopsies of patients suffering from acute hepatitis.

IIIrd meeting of the European Association for the study of the liver. Modena 1968

25. Schaffner, F., Javitt, N.B.:

Morphologic changes in hamster liver during intrahepatic Cholestasis induced by Tauroolithocholate.

Lab. Invest. 15; 1783 (1966)

26. Schlicht, I., Koransky, W., Marcour, S.,
Schulte-Hermann, R.:

Größe und DNA-Synthese der Leber unter dem Einfluß körperfremder Stoffe.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. u. exp. Path.
261; 26-41 (1968)

27. Schulte-Hermann, R. et al.:

Zahl und Ploidiegrad der Zellkerne der Leber unter
dem Einfluß körperfremder Stoffe.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. u. exp. Path.
261; 42-58 (1968)

28. Sperry, W.M., Webb, M.:

A revision of the Schoenheimer-Webb method for
Cholesterol determination.

J. Biol. Chem. 187; 97 (1950)

29. Winer, A.D.:

Crystallisation of Nicotinamide Adenine Dinucleo-
tide. J. Biol. Chem. 239; 3598 (1964)

30. Winter, E.:

Inaugural Dissertation an der Medizinischen
Fakultät der Justus Liebig-Universität Gießen
in Vorbereitung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Kühn
für die Überlassung des Themas und Herrn
Dr. E. Richter für die Bereitstellung eines
Arbeitsplatzes und seine fortwährende freund-
liche Unterstützung.

VIII. LEBENSLAUF

Am 2.9.1943 wurde ich als Sohn des Regierungsveterinärrates Dr. Julius Schneider und seiner Ehefrau Lieselotte in Alzey geboren.

1950 wurde ich eingeschult und bestand 1963 die Reifeprüfung am Gymnasium Nidda.

Nach Ableistung meines zwölfmonatigen Grundwehrdienstes begann ich 1964 mit dem Studium der Medizin an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz, wo ich 1966 die ärztliche Vorprüfung ablegte. 1967 setzte ich das klinische Studium an der Justus Liebig-Universität Gießen fort, an der ich am 23.1.1970 die ärztliche Prüfung abgelegt habe.

